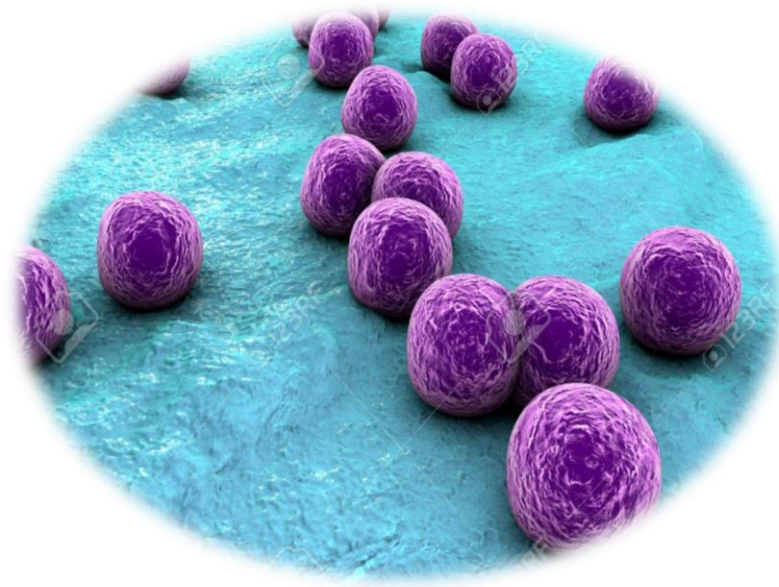


Universidad de La Laguna

Facultad de Ciencias de la Salud – Sección de Farmacia

Actividad del Celastrol frente a *Staphylococcus aureus*

Resistente a Meticilina (SARM)



Danila Martins Ginó

Grado en Farmacia

Trabajo Fin de Grado

Tutora: Laila Moujir Moujir

2018

Resumen

Staphylococcus aureus es una bacteria comensal que con frecuencia se relaciona con infecciones en humanos. Tiene una notable habilidad para adquirir resistencia a los antibióticos y la aparición de cepas resistente a meticilina (SARM) son una de las causas principales de infecciones hospitalarias. Su epidemiología está cambiando ya que cada vez se detectan más en la comunidad y su origen no está relacionado con el hospital o los cuidados sanitarios, siendo denominadas SARM-CA. Todo ello, dificulta el tratamiento de las infecciones provocadas por estas bacterias, lo cual se ha agravado por la aparición de pérdida de sensibilidad a la vancomicina.

Este trabajo tiene como objetivo, determinar por el método de microdilución, la actividad anti-estafilocócica del celastrol, un triterpeno metilénquinona, aislada de especies de la familia Celastraceae, frente a cepas de *S. aureus* resistente a meticilina, aisladas de la comunidad y del ambiente hospitalario.

El celastrol resultó ser más activo que oxacilina, frente a las cepas de *S. aureus* AB12h y AB42c, y a éstas junto a *S. aureus* AB1c y AB47c que la vancomicina. Así mismo, presentó un mecanismo bactericida frente a los aislados de *S. aureus* AN8, AB1c y AB8c, a diferencia de la cepa de *S. aureus* ATCC6538 utilizada como referencia, que tuvo un comportamiento bacteriostático.

Palabras clave: SARM, celastrol, actividad anti-estafilocócica

Abstract

Staphylococcus aureus is a commensal bacterium that is often associated with infections in humans. It has a remarkable ability to acquire resistance to antibiotics. Increasing of the appearance of methicillin resistance *Staphylococcus aureus* (MRSA) are one of the main causes of hospital infections. The epidemiology of MRSA is changing, with a emergence of community associated MRSA (MRSA-CA) in contrast to healthcare associated MRSA. Therefore, these infections are more difficult to treat than other, which has been increased by reduction of sensitivity to vancomycin.

The objective of this work is to determine by the microdilution method the anti-staphylococcal activity of celastrol, a triterpene methilenquinone, isolated from species of the Celastraceae family, against strains of methicillin-resistant *S. aureus* isolated from the community and the hospital environment.

Celastrol was found to be more active than vancomycin compared to strains of *S. aureus* AB1c and AB47c and *S. aureus* AB12h and AB42c than oxacillin. Likewise, it presented a bactericidal mechanism against the isolates *S. aureus* AN8, AB1c and AB8c, and bacteriostatic effect against *S. aureus* ATCC6538 used as reference strain.

Keywords: MRSA, celastrol, anti-staphylococcal activity

Índice

1	Introducción	5
2	Objetivos	7
3	Material y Métodos	8
3.1	Microorganismos	8
3.2	Mantenimiento y conservación de las bacterias.....	8
3.3	Productos.....	8
3.4	Medios de cultivo y soluciones de trabajo	8
3.5	Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Mínima Bactericida (CMB).....	11
4	Resultados y Discusión	12
4.1	Determinación de la actividad antimicrobiana	12
5	Conclusiones	18
	Referencias Bibliográficas.....	19

1 Introducción

A pesar de la mayor proporción de infecciones nosocomiales causadas por microorganismos Gram-negativos (aproximadamente el 55% en España) en comparación con los producidos por microorganismos Gram-positivos (35%), este último sigue siendo un problema importante en el tratamiento de pacientes hospitalizados.¹

El género *Staphylococcus* está formado por cocos Gram positivos, aerobio facultativo, no esporulados, inmóviles y catalasa positiva.^{2,3} Es una bacteria comensal y patógena humana, que forma parte de la microbiota de las mucosas y piel siendo las fosas nasales el lugar predominante de la colonización. Se estima que un 20-30% de la población mundial es portadora de *S. aureus* de forma permanente, mientras que un 50-60% es colonizada temporalmente, actuando como portadora solo en el momento de la colonización. El 20% restante nunca llega a colonizarse,³ debido según Zipperer *et al*⁴ a que sus fosas nasales son colonizadas por *S. lugdunensis*, habitante habitual de la nariz, y que produce lugdunina, un antibiótico tiazolidínico, que impide la colonización por *S. aureus* en las fosas nasales.

S. aureus es un importante patógeno tanto nosocomial como comunitario, que produce un amplio rango de infecciones que afectan a la piel y mucosas, infecciones respiratorias, osteoarticulares, bacteriemias y endocarditis, así como infecciones por técnicas invasivas.⁵

S. aureus tiene una notable habilidad para adquirir resistencia a los antibióticos. Su capacidad ha resultado en la aparición de *S. aureus* resistente a meticilina (SARM), a principios de la década de 1960, diseminándose por los hospitales de todo el mundo, y cuya incidencia en España, es alrededor del 30%.⁶⁻⁸ Esta resistencia se debe a la transcripción del gen cromosómico *mecA*, que genera una nueva proteína fijadora de penicilina (PBP2a) con muy baja afinidad por los β -lactámicos.⁹ La tipificación de SARM ha hecho que sea más fácil conocer las diferencias entre los clones eminentemente hospitalarios (SARM-HA), los clones comunitarios (SARM-CA) y los relacionados con los animales (SARM-LA).¹

Los SARM tienen particular importancia, ya que suelen ser resistentes a otros antibióticos betalactámicos y a diferentes grupos de antibióticos como macrólidos,

fluoroquinolonas y aminoglucósidos. siendo asociados a una alta morbilidad y mortalidad.^{3,10} Además, están apareciendo resistencias extrínsecas frente a antibióticos de uso hospitalario para el tratamiento actual de SARM, como vancomicina y linezolid. La vancomicina es la terapia antibiótica de primera línea para estas infecciones, sin embargo, el conocimiento de la posible transferencia del plásmido *vam* A por conjugación desde *Enterococcus faecalis* a *S. aureus* ha llevado a la aparición de *S. aureus* con resistencia intermedia a vancomicina (VISA).¹¹ Estos hechos hacen necesario actualmente confirmar la sensibilidad a la vancomicina ante un aislado estafilocócico.

Debido al aumento de la aparición de resistencia a los antibióticos, cada vez es más complicado el tratamiento de las infecciones microbianas, que se creían estaban bajo control, lo que exige la estricta necesidad de buscar nuevos agentes antimicrobianos con nuevos mecanismos de acción. Con esta idea, se ha centrado en los últimos años, la investigación de los vegetales como una fuente de metabolitos capaces de solucionar esta gran problemática.

Celastrol (Figura 1), también conocido como tripterina, es una triterpeno metilénquinona, aislada exclusivamente de la corteza de la raíz de especies de la familia Celastraceae, conocida como “agridulce”. Se trata de un pigmento rojo que fue aislado por primera vez por Gisvold de *Celastrus scandes* y que exhibe una amplia variedad de actividades como antioxidante, antiinflamatoria, antiviral, anticancerígena y antimicrobiana.¹²⁻¹⁸ Es activo frente a una amplia variedad de bacterias Gram positivas y en un estudio relación estructura-actividad antimicrobiana (SAR) de triterpeno metilénquinonas aisladas de *Schaefferia cuneifolia* y *Maytenus horrida* se establece que la conjugación de los anillos A y B, es un requerimiento estructural para la actividad antimicrobiana y que el grupo más efectivo en el anillo E es el grupo carboxilo en C-20, que posee el celastrol.^{19,20}

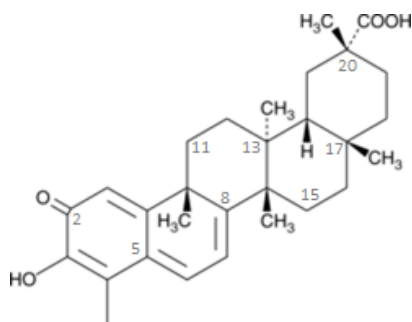


Figura 1. Estructura química del celastrol.

2 Objetivos

De acuerdo con los antecedentes planteados el objetivo de este trabajo es determinar la actividad anti-estafilocócica del celastrol frente a cepas de *S. aureus* resistente a meticilina.

3 Material y Métodos

3.1 Microorganismos

Para la realización del presente trabajo se han empleado las estirpes bacterianas *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y 10 cepas de *S. aureus* resistente a meticilina (SARM), aisladas previamente por nuestro grupo de investigación del ambiente nosocomial y comunitario: *S. aureus* AN8, *S. aureus* AB12h, *S. aureus* AB1c, *S. aureus* AB8c, *S. aureus* AB21c, *S. aureus* AB31c, *S. aureus* AB42c, *S. aureus* AB47c, *S. aureus* AB48c y *S. aureus* AB49c.

3.2 Mantenimiento y conservación de las bacterias

Las bacterias fueron mantenidas en Triptona soja agar (Oxoid) que en lo sucesivo será denominado como TSA, y conservadas a 4° C, llevándose a cabo resiembras periódicas.

La conservación de las cepas durante largos periodos de tiempo se realizó por congelación (-80° C), empleando una suspensión celular en glicerol al 20% (v/v).

3.3 Productos

El celastrol y los antibióticos de referencia han sido disueltos en dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich) a la concentración de 5000 µg/ml, según la Tabla 1.

Tabla 1. Preparación del celastrol y de los antibióticos de referencia.

Producto	Peso	Volumen de DMSO	Color de la solución
Celastrol	1,7 mg	0,34 mL	Naranja
Vancomicina	2,2 mg	0,44 mL	Transparente
Oxacilina	1,6 mg	0,32 mL	Transparente

Las soluciones de oxacilina y vancomicina fueron mantenidos a 4°C y por un tiempo no superior a 7 días.

3.4 Medios de cultivo y soluciones de trabajo

Como medios líquidos, para la realización de los diferentes experimentos, se emplearon los siguientes:

Medio Extracto de levadura–Peptona, que en lo sucesivo será designado como YP y cuya composición es la siguiente:

Composición	Cantidad
Peptona (Meat-peptona, Sigma-Aldrich)	10 g
Extracto de levadura (Yeast extract, Sigma-Aldrich)	10 g
Agua destilada	1000 mL

Este medio fue esterilizado en autoclave a 121°C durante 20 minutos y mantenidos a 4°C hasta su uso.

Caldo Triptona Soja (Oxoid), que en lo sucesivo será designado como TSB y cuya composición es la siguiente:

Composición	Cantidad
Digestión pancreática de caseína	17g
Digestión enzimática de soja	3g
Cloruro de Sodio	5g
Hidrogenofosfato de di-potasio	2,5g
Glucosa	2,5g
Agua destilada	1000mL

Este medio fue esterilizado en autoclave a 121°C durante 20 minutos y mantenidos a 4°C hasta su uso.

Caldo Triptona Soja (Oxoid) suplementado con NaCl al 2%, que en lo sucesivo será designado como TSB+NaCl2% y cuya composición es la siguiente:

Composición	Cantidad
Digestión pancreática de caseína	17g
Digestión enzimática de soja	3g
Cloruro de Sodio	25g
Hidrogenofosfato de di-potasio	2,5g
Glucosa	2,5g
Agua destilada	1000mL

Este medio fue esterilizado en autoclave a 121°C durante 20 minutos y mantenidos a 4°C hasta su uso.

Como medio sólidos, para la realización de los diferentes experimentos se emplearon:

Triptona Soja Agar (Oxoid), que en lo sucesivo será designado como TSA y cuya composición es la siguiente:

Composición	Cantidad
Digestión pancreática de caseína	15g
Digestión enzimática de soja	5g
Cloruro de Sodio	5g
Agar	15g
Agua destilada	1000mL

Este medio fue esterilizado en autoclave a 121°C durante 20 minutos y mantenidos a 4°C hasta su uso.

Müller-Hinton Agar (PanReac) **suplementado con 2% de cloruro sódico**, que en lo sucesivo será designado como MHA+NaCl2% y cuya composición es la siguiente:

Composición	Cantidad
Hidrolizado de peptona de caseína	17.5g
Infusión de carne	2.0g
Almidón	1.5g
Cloruro de Sodio	20g
Agar	17g
Agua destilada	1000mL

Este medio fue esterilizado en autoclave a 121°C durante 20 minutos y mantenidos a 4°C hasta su uso.

Solución Salina, cuya composición es la siguiente:

Composición	Cantidad
Cloruro de Sodio	9 g
Agua destilada	1000 mL

Esta solución fue esterilizada en autoclave a 121°C durante 20 minutos.

3.5 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Mínima Bactericida (CMB)

Las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) y bactericidas (CMB) fueron determinadas por el método de microdilución en medio líquido utilizando placas de 96 pocillos (Nunc, ThermoScientific). El celastrol y los antibióticos de referencia previamente disueltos en DMSO, se añadieron en el medio de experimentación (TSB) a doble concentración de la requerida para el ensayo.

Se depositaron 200 µL del producto a evaluar al doble de concentración en el medio de cultivo en uno de los pocillos (columna 2) y 100 µL de medio en los restantes, para continuación llevar a cabo diluciones seriadas a mitades. Estas placas fueron inoculadas con 100 µL de una suspensión del microorganismo a ensayar, preparada a partir de cultivos de 20 horas en agitación a 37°C en YP. Estas fueron diluidas convenientemente en el medio de cultivo (TSB o TSB+NaCl2%) de manera que quedara una concentración celular en los pocillos de $1-5 \times 10^5$ u.f.c/mL. Cada ensayo fue realizado por duplicado y como control positivo se inocularon pocillos (columna 12) en las mismas condiciones, pero carentes de producto. El control negativo (blanco control), se preparó añadiendo 200 µL de medio a una columna de pocillos (columna 1).

Tras 24 horas de incubación a 37°C o 35°C en agitación, se determinó la turbidez de los cultivos en un lector de ELISA (Tecan Infinite M200) a 550 nm. De aquellos pocillos en los que no se observó crecimiento visible, se tomaron alícuotas para efectuar un recuento de unidades viables, con el fin de establecer la CMI (mínima concentración de producto a la cual no hubo crecimiento)²¹ y la CMB (mínima concentración de producto que produjo la muerte del 99,9% de la población inicial).²²

4 Resultados y Discusión

4.1 Determinación de la actividad antimicrobiana

La cuantificación de la actividad *in vitro* del celastrol y de los antibióticos de referencia se evaluó mediante el método de microdilución.

Como puede comprobarse en la Tabla 2, el celastrol presentó una actividad anti-estafilocócica frente a las cepas de SARM, similar a la obtenida sobre *S. aureus* ATCC 6538, empleada como referencia, a excepción de *S. aureus* AB12h (CMI= 0,31 vs 1,25 µg/mL).

Cuando el comportamiento de una sustancia antimicrobiana es bactericida, los valores de CMI y CMB son próximos (habitualmente difieren en una o dos diluciones), por lo que podemos deducir que el celastrol tiene un comportamiento bactericida frente a *S. aureus* AN8, *S. aureus* AB1c y *S. aureus* AB8c. En ocasiones esto no ocurre y estamos ante los fenómenos: paradójico, de persistencia y de tolerancia que se define como la disminución o desaparición de la capacidad de matar de un antibacteriano en un determinado aislamiento o especie, es decir cuando la CMB/CMI>32. Dicho fenómeno, se presentó con las cepas de SARM AB31c, AB42c y AB12h. Así mismo, el efecto paradójico o de Eagle, que consiste en que se detecta una presencia de un mayor número de bacterias supervivientes a concentraciones superiores a la CMB fue observado tras el tratamiento con oxacilina frente a los aislados AB21c, AB49c y AN8.

La oxacilina se comportó como una sustancia bactericida frente a todas las cepas de *S. aureus* a excepción de AB42c y AB12h, que resultaron ser claramente resistentes a dicho antibiótico (valores de CMI de 3 y 12 µg/mL, respectivamente), que según la EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) se considera que *S. aureus* es resistente a oxacilina y vancomicina cuando la CMI>2 µg/mL.²³ Por ello, los aislados *S. aureus* AB1c, AB42c AB47c y AB12h deben ser asimismo resistentes a vancomicina. Ahora bien, dado que el valor de CMB es a su vez de 2,5 µg/mL (una reducción con respecto al inóculo inicial ≥ 3 Log), no podemos afirmar que sean claramente resistentes a vancomicina, pues deberíamos evaluar concentraciones intermedias entre 2,5 y 2,1 µg/mL.

Si comparamos los resultados obtenidos para el celastrol *versus* oxacilina, cabe resaltar que la metilenquinona resultó ser más activa frente a las cepas resistentes de *S. aureus* AB42c (CMI, 0,3 µg/mL vs 3 µg/mL) y *S. aureus* AB12h (0,3 µg/mL vs 12 µg/mL). Estos datos nos inducen a pensar en el celastrol como una posible alternativa en el tratamiento de infecciones producidas por SARM. En relación a celastrol *versus* vancomicina, la quinona resultó ser más activa que el antibiótico de referencia, frente a todas las cepas ensayadas, a excepción de *S. aureus* AN8, AB8c y AB49c.

Tabla 2. Concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) y mínimas bactericidas (CMB) expresadas en µg/mL de celastrol, vancomicina y oxacilina frente a las cepas de *S. aureus*.

	Celastrol		Vancomicina		Oxacilina	
	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	1,25-0,63	>40	1,5-0,75	50	0,09	0,19
<i>S. aureus</i> AN8	1,25-0,63	5	1,25-0,63	1,25	0,38-0,19	0,38
<i>S. aureus</i> AB12h	0,31-0,15	20	2,50-1,25	2,50	12-6	>12
<i>S. aureus</i> AB1c	0,63-0,31	1,25	2,50-1,25	2,50	0,09	0,19
<i>S. aureus</i> AB8c	1,25-0,63	5	1,25-0,63	1,25	0,09-0,05	0,19
<i>S. aureus</i> AB21c	0,63	10	1,25-0,63	1,25	0,19-0,09	0,38
<i>S. aureus</i> AB31c	0,63-0,31	20	1,25-0,63	1,25	0,38-0,19	0,38
<i>S. aureus</i> AB42c	0,63-0,31	20	2,50-1,25	2,50	3-1,5	12
<i>S. aureus</i> AB47c	0,63-0,31	5	2,50-1,25	5	0,19-0,09	0,19
<i>S. aureus</i> AB48c	0,63-0,31	20	1,25-0,63	1,25	0,19-0,09	0,19
<i>S. aureus</i> AB49c	1,25-0,63	20	1,25-0,63	2,5	0,19-0,09	0,38

Hay que destacar, que sólo a concentraciones elevadas de celastrol, se desarrollaron colonias en las placas de TSA, pequeñas (~10 veces menor a la de los cultivos control) y despigmentadas. Además, tras el tratamiento de *S. aureus* AB1C con celastrol a 1,25 µg/mL se desarrollaron a su vez colonias blancas, en contraposición al color dorado propio de *S. aureus*, como se muestra en la Figura 2.

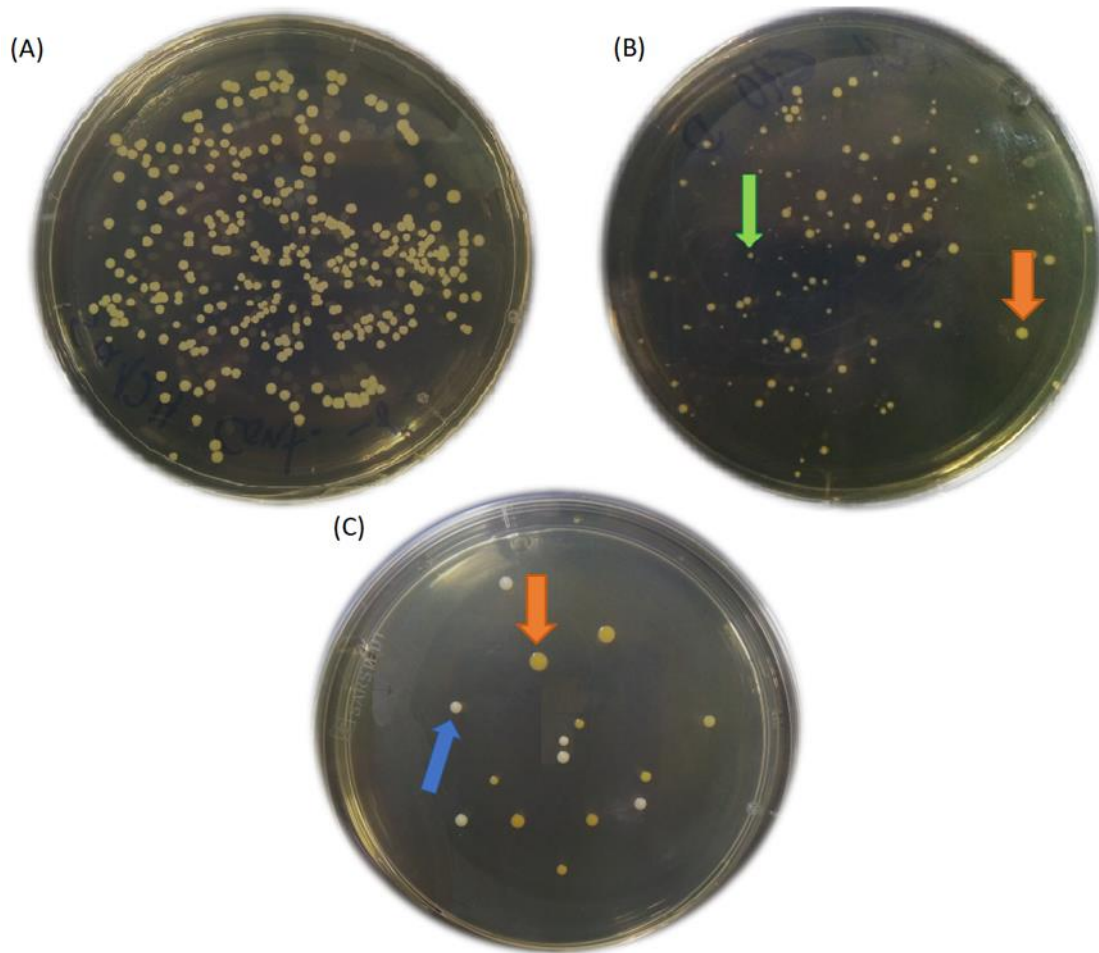


Figura 2. Colonias de *S. aureus* AB12h del cultivo control desarrolladas en medio TSA tras 24h (A) y tratadas con celastrol a la concentración de 10 µg/mL (B). Nótese las colonias de reducido tamaño indicado por la flecha verde y en naranja las de tamaño similar al control. (C) Colonias de *S. aureus* AB1C desarrolladas en medio TSA durante 24h en presencia de celastrol a 1,25 µg/mL, indicándose con la flecha naranja las colonias doradas típicas de *S. aureus* y con la flecha azul las colonias no pigmentadas.

Estas colonias que pueden confundirse como contaminantes fueron sometidas a una tinción de Gram, correspondiéndose como se muestra en la Figura 3 a cocos Gram positivos en racimos. Estos cambios morfológicos, se atribuyen a variantes de *S. aureus* tras el tratamiento de determinados antibióticos, como consecuencia de mutaciones en la cadena respiratoria.³ Este fenómeno, está en concordancia con el mecanismo de acción del celastrol, que actúa sobre los procesos oxidativos de la cadena respiratoria.²⁴

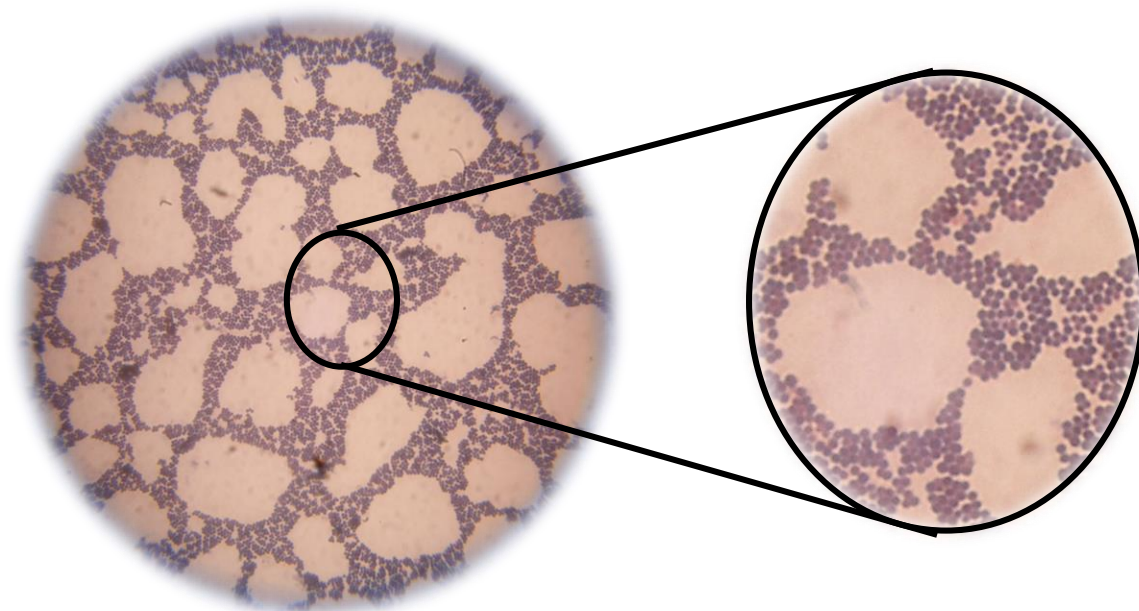


Figura 3. Células de *S. aureus* AB1C teñidas mediante la tinción de Gram y tras el tratamiento con celastrol a 1,25 µg/mL. (Ampliación 1000x)

Las cepas de SARM, a excepción de AB42c y AB12h, según la EUCAST²³ no serían consideradas resistentes a la oxacilina. En este sentido, cabe indicar que la resistencia a la oxacilina y mediada por el gen *mec A*, se afecta por diferentes factores como la temperatura, tiempo de incubación, osmolaridad, pH y la presencia de genes reguladores y de otros genes no relacionados. Se pueden diferenciar dos tipos de cepas de SARM, unas con resistencia homogénea (prácticamente toda la población expresa la resistencia) y otras con resistencia heterogénea (CMI entre 1-16 µg/mL) donde solo una pequeña proporción de la población ($\leq 0,1\%$) sobrevive con concentraciones de oxacilina superiores a 10 µg/mL, mientras que la mayor parte no es viable con bajas concentraciones del antimicrobiano. La mayoría de los aislados presentan este patrón de resistencia en las condiciones rutinarias de cultivo. Sin embargo, la heterorresistencia se puede mostrar como homogénea variando las condiciones de cultivo.⁸ Por ello, repetimos los experimentos variando la osmolaridad, para lo cual el medio TSB fue suplementado con un 2% de NaCl y la incubación se realizó a 35°C. Así mismo, el inóculo fue preparado a partir de colonias obtenidas en placas de MH+ NaCl 2%, que fueron resuspendidas en suero fisiológico, equivalente a la escala 0,5 de McFarland y posteriormente diluicionados en medio de cultivo de manera de quedarse una concentración de 5×10^5 UFC/mL/pocillo.

Las placas multipocillos preparadas en estas nuevas condiciones, fueron incubadas durante 24 y 48h a 35°C, procediéndose tras la incubación a medir la absorbancia de los cultivos a 550 nm y tomando muestras de aquellos pocillos en los que no hubo crecimiento visible, como se detalló en Materiales y Métodos. Las placas MH + NaCl 2% fueron incubadas durante 48 horas a 35°C. En la Figura 4, se muestran los valores de CMI de oxacilina tras 24 h de incubación, en las nuevas condiciones experimentales. Como puede comprobarse, al comparar los valores de CMI obtenidas inicialmente (Tabla 2), todas las cepas testadas resultaron ser más resistentes a la oxacilina, a excepción de la AB31c y AB47c, con lo que la sensibilidad de *S. aureus* a la oxacilina se ve afectada por las nuevas condiciones experimentales, seleccionando una parte de la población que es capaz de crecer a concentraciones superiores del antibiótico.

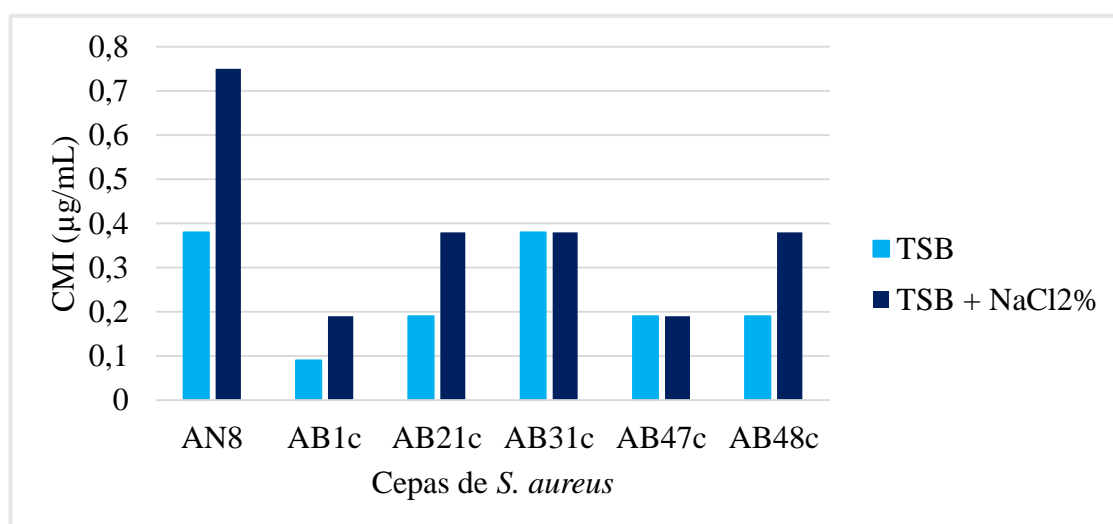


Figura 4. Concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de oxacilina frente a las cepas de *S. aureus* AN 8, AB1c, AB21c, AB31c, AB47c y AB48c en medio TSB a 37°C (■) y en medio TSB + NaCl 2% a 35°C (■) durante 24h de incubación.

En la Figura 5, se muestran los resultados obtenidos tras 48 h de incubación, donde puede observarse que la CMI, aumentó entre 1 y 3 veces, a excepción de *S. aureus* AB21c y AB 48c, en estas condiciones. Cabe reseñar que en las placas de MH+NaCl 2% a tiempos de incubación prolongados (>48h), se desarrollaron colonias translúcidas y pequeñas en presencia de oxacilina a 6 µg/mL. procedentes de los cultivos de *S. aureus* AN8, AB1c y AB31c.

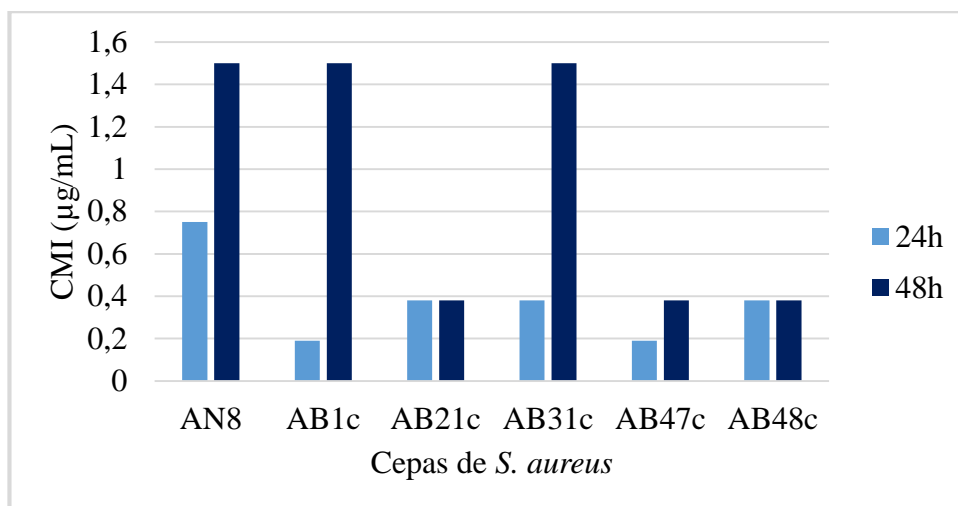


Figura 5. Concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de oxacilina frente a las cepas SARM AN 8, AB1c, AB21c, AB31c, AB47c y AB48c en medio TSB + NaCl2% e incubados a 35°C durante 24 horas (■) y 48 horas (■).

Así mismo, se expuso los cultivos de *S. aureus* AB 21c y AB48c a la acción del celastrol, para averiguar si las condiciones experimentales, afectan a su vez a la actividad del compuesto. Como se muestra en la Figura 6, los valores de CMI para el celastrol son inferiores cuando no existe un suplemento de cloruro sódico en el medio de cultivo. Una explicación a este hecho, es que el grupo carboxilo en C20 del celastrol, puede reaccionar con el sodio y formarse la sal sódica, que carece de actividad.²⁴

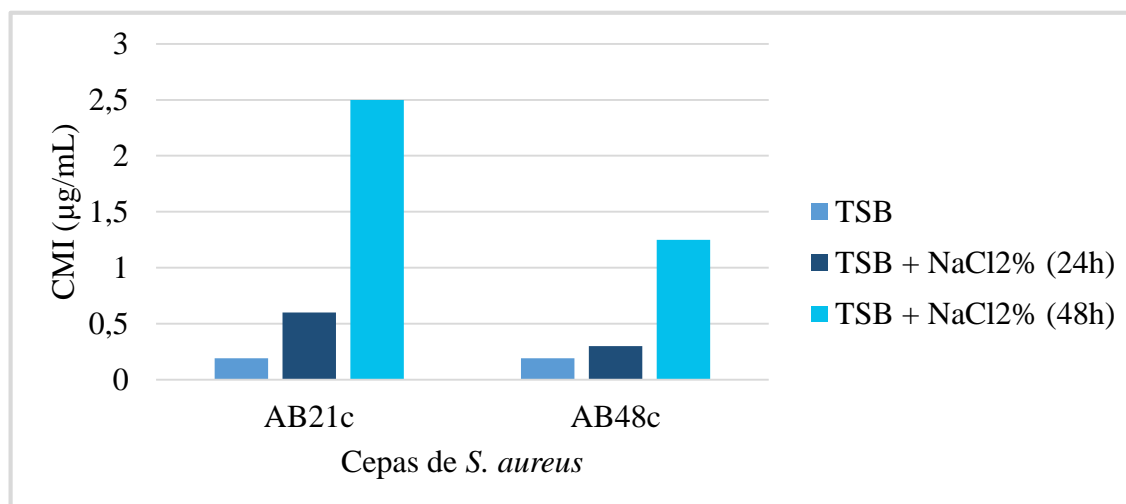


Figura 6. Concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de celastrol frente a *S. aureus* AB 21c y AB48c, obtenidas en las tres condiciones experimentales: medio TSB a 37°C durante 24 horas (■), en medio TSB + NaCl2% a 35°C durante 24 horas (■) y en medio TSB + NaCl 2% a 35°C durante 48 horas de incubación (■).

5 Conclusiones

1. El celastrol presentó un mecanismo bactericida frente a los aislados de *S. aureus* AN8, AB1c y AB8c.
2. El celastrol resultó ser cuatro veces más activo frente a las cepas SARM AB42c y AB12h que los antibióticos de referencia oxacilina y vancomicina, para el cual también fue más activo frente a los aislados *S. aureus* AB1c y AB47c, por lo que podría resultar una alternativa en el tratamiento de las infecciones provocadas por cepas resistentes a oxacilina y vancomicina.
3. El celastrol, pierde actividad cuando existe un incremento de sal en el medio de cultivo, como consecuencia del bloqueo del grupo carboxilo, que es fundamental para la expresión de la actividad.
4. La expresión de la heterorresistencia a la oxacilina de algunas de las cepas de *S. aureus*, especialmente AB1c, AB31c y AN8, se induce como homorresistente con los cambios de osmolaridad, temperatura y tiempo de incubación.

Referencias Bibliográficas

1. Cantón R, Ruiz-Garbajosa P. Infecciones causadas por bacterias grampositivas multirresistentes(*Staphylococcus aureus* y *Enterococcus spp.*). *Enferm Infecc Microbiol Clin* [Internet]. 2013;31(8):543–51. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.eimc.2013.08.001>
2. Barroso H, Meliço - Silvestre A, Taveira N, Duarte A. *Microbiologia Médica*. Lidel, editor. Lisboa; 2014.
3. Cervantes-García E, García-González R, Salazar-Schettino PM. Características generales del *Staphylococcus aureus*. *Rev Latinoam Patol Clin Med Lab* [Internet]. 2014;61(1):28–40. Available from: www.medigraphic.com/patologiaclinica%5Cnwww.medigraphic.org.mx
4. Zipperer A, Konnerth MC, Laux C, Berscheid A, Janek D, Weidenmaier C, et al. Human commensals producing a novel antibiotic impair pathogen colonization. *Nature* [Internet]. 2016;535(7613):511–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nature18634>
5. Tong SYC, Davis JS, Eichenberger E, Holland TL, Fowler VG. *Staphylococcus aureus* infections: Epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clin Microbiol Rev*. 2015;28(3):603–61.
6. DeLeo FR, Otto M, Kreiswirth BNB, Chambers HFH. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* [Internet]. 2010;375(9725):1557–68. Available from: [http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673609619991%5Cnhttp://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)61999-1](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673609619991%5Cnhttp://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(09)61999-1)
7. Rodríguez-Baño J, Bischofberger C, Álvarez-Lerma F, Asensio A, Delgado T, García D, et al. Vigilancia y control de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina en hospitales españoles. Documento de consenso GEIH-SEIMC y SEMSPH. *Med Prev*. 2008;14(2):18–31.

8. Ardanuy C, Cercenado E, Morosini M, Torres C. Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en grampositivos. *Procedimientos en Microbiología Clínica*. Seimc. 2011; 1-18.
9. Gómez-Alonso B, Rodríguez-Álvarez C, Hernández BC, Rodríguez ÀA, Aguirre-Jaime A, Fernández ML. El servicio de urgencias hospitalario como factor de riesgo de colonización por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina de los residentes en centros de larga estancia. *Emergencias*. 2016;28(6):381–6.
10. Woo S-G, Lee S-Y, Lee S-M, Lim K-H, Ha E-J, Eom Y-B. Activity of novel inhibitors of *Staphylococcus aureus* biofilms. *Folia Microbiol (Praha)* [Internet]. 2017;62(2):157–67. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s12223-016-0485-4>
11. Wang Y, Li X, Jiang L, Han W, Xie X, Jin Y, et al. Novel mutation sites in the development of vancomycin- intermediate resistance in *Staphylococcus aureus*. *Front Microbiol*. 2017;7:1–12.
12. Dai Y, Desano J, Tang W, Meng X, Meng Y, Burstein E, et al. Natural proteasome inhibitor celastrol suppresses androgen-independent prostate cancer progression by modulating apoptotic proteins and NF-kappaB. *PLoS One*. 2010;5(12):1–9.
13. Zhu H, Liu X, Cai T, Cao J, Tu C, Lu W, et al. Celastrol Acts as a Potent Antimetastatic Agent Targeting - Integrin and Inhibiting Cell-Extracellular Matrix Adhesion , in Part via the p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway. *J Pharmacol Exp Ther*. 2010;334(2):489–99.
14. Venkatesha SH, Yu H, Rajaiah R, Tong L, Moudgil KD. Celastrus-derived celastrol suppresses autoimmune arthritis by modulating antigen-induced cellular and humoral effector responses. *J Biol Chem*. 2011;286(17):14138–46.
15. Kim DH, Shin EK, Kim YH, Lee BW, Jun JG, Park JHY, et al. Suppression of inflammatory responses by celastrol, a quinone methide triterpenoid isolated from *Celastrus regelii*. *Eur J Clin Invest*. 2009;39(9):819–27.

16. Bufu T, Di X, Yilin Z, Gege L, Xi C, Ling W. Celastrol inhibits colorectal cancer cell proliferation and migration through suppression of MMP3 and MMP7 by the PI3K/AKT signaling pathway. *Anticancer Drugs*. 2018;1–9.
17. Lin L, Sun Y, Wang D, Zheng S, Zhang J, Zheng C. Celastrol ameliorates ulcerative colitis-related colorectal cancer in mice via suppressing inflammatory responses and epithelial-mesenchymal transition. *Front Pharmacol*. 2016; 6:1–14.
18. Ooi N, Eady EA, Cove JH, O’neill AJ. Redox-active compounds with a history of human use: Antistaphylococcal action and potential for repurposing as topical antibiofilm agents. *J Antimicrob Chemother*. 2015;70(2):479–88.
19. Moujir L, Gutiérrez-navarro AM, González AG, Ravelo AG, Luis JG. The relationship between structure and antimicrobial activity in quinones from the Celastraceae. *Biochem Syst Ecol*. 1990; 18:25–8.
20. González A, Ravelo AG, Bazzocchi IL, Jiménez A, González CM, Luis JG, et al. Biological study of triterpenequinones from Celastraceae. II *Farm*. 1988; 43:501–5.
21. Clinical and Laboratory Standards Institute. M07-A10. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically. *Approv Stand Ed CLSI Doc M07-A10* [Internet]. 2015;(10):1–87. Available from: https://clsi.org/media/1632/m07a10_sample.pdf http://shop.clsi.org/site/Sample_pdf/M07A10_sample.pdf
22. Clinical and Laboratory Standards Institute. M26-A: Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents; Approved Guideline. 1999;19(18).
23. EUCAST. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. 2018. Available from: http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_8.0_Breakpoint_Tables.pdf
24. Padilla Montañó N. Mecanismo de Acción de Triterpenoquinonas de Celastráceas. Universidad de La Laguna; 2009.